

# FRECUENCIAS ALÉLICAS DE BETA-LACTOGLOBULINA EN GANADO CRIOLLO LIMONERO

## Allelic Frequency of Beta-lactoglobulin in Limonero Creole Cattle

*Inioska Rojas*<sup>2</sup>, *José Aranguren-Méndez*<sup>1\*</sup>, *María Portillo*<sup>1</sup>, *Yenen Villasmil-Ontiveros*<sup>1</sup>,  
*Xomaira Rincón*<sup>1</sup> y *Gloria Contreras*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Universidad del Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, Laboratorio de Genética Molecular.* <sup>2</sup> *Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.* <sup>3</sup> *Instituto Nacional Investigaciones Agropecuarias-Zulia, Estación Carrasquero.*

*E-mail: atilio.aranguren@fcv.luz.edu.ve - jaaranguren@luz.edu.ve*

### RESUMEN

Con el objeto de caracterizar el gen de la beta-lactoglobulina (BLG) en la raza Criollo Limonero, se utilizó la técnica PCR-RFLP en 163 animales puros de la estación local Carrasquero (Carrasquero-estado Zulia), los genotipos fueron determinados a través de electroforesis en geles de agarosa. Las frecuencias obtenidas del locus de la BLG fueron A (0,22) y B (0,78) y las frecuencias genotípicas fueron AA (0,07); AB (0,29) y BB (0,64), la población estudiada se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ), los resultados indican que la frecuencia alélica del alelo B fue más alta que la de A, siendo esto importante, ya que se han determinado los efectos de esta variante alélica de la BLG sobre la cantidad de grasa y proteínas en la leche, la selección a favor del alelo B en la población conllevará a una mejora en la calidad y rendimiento en la producción de queso, estos resultados representan un valioso aporte al conocimiento de esta raza y de su importancia, ya que, representa una alternativa para sistemas dirigidos a la producción de queso.

### Palabras clave:

Beta-lactoglobulina, PCR, ganado Criollo Limonero, frecuencias alélicas.

### ABSTRACT

In order to characterize the beta-lactoglobulin gene (BLG) in the Limonero Creole cattle through PCR-RFLP technique, 163 purebred animals were used from the Carrasquero local station (Carrasquero-Zulia State), genotypes were determined through gel electrophoresis in agarosa. Gene and genotypic frequencies obtained were A (0.22) and B (0.78) and AA (0.07), AB (0.24) and BB (0.64) respectively, the population is in equilibrium of Hardy-Weinberg with ( $P < 0.05$ ), the results indicate that the allelic frequency of was more high B but that A, being this important one, since the effects of the variants of the BLG on the amount of fat and proteins in milk have been determined, the selection in favor of allele B in the population will entail to an improvement in the quality and yield in the cheese production, these results represent a valuable contribution the knowledge of this race and its importance, since, represents an alternative for systems directed to the cheese production.

### Key words:

Beta-lactoglobulin, PCR, Limonero Creole cattle, allelic frequencies.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha desarrollado un interés por evaluar y preservar los recursos genéticos presentes en el país. Aquí se incluye el Criollo Limonero, raza local descendiente de bovinos europeos (*Bos taurus*) traídos durante la época de la conquista, que presentan buena habilidad para el pastoreo y alta capacidad de conversión de pastos de baja calidad, en productos como leche y carne [36], convirtiéndose en un ejemplar invalorable que ha subsistido luego de un proceso de selección natural de varias décadas y es posible portador de genes de importancia para la producción animal en la zona tropical, además de la conocida tolerancia al calor y resistencia a plagas y enfermedades. Por este motivo, se ha señalado la necesidad de rescatar y mejorar esta raza para aprovechar sus bondades [15, 29, 35].

La raza Criollo Limonero ha sido orientada hacia la producción lechera; este producto tiene como función principal, alimentar a las crías hasta que sean capaces de digerir otro alimento, y además de esto, es la materia prima para la fabricación de queso y otros productos lácteos, los cuales forman parte de la dieta diaria del ser humano [4, 17]. La leche está constituida, en gran parte, por las caseínas y las proteínas del suero, estas últimas representan el remanente soluble luego de haber precipitado las caseínas a pH 4,6, una de las funciones principales de estas proteínas es su contribución a los valores nutritivos debido a su alto contenido de aminoácidos esenciales, siendo este aporte mayor que el de la caseína [17].

### [Frame 15](#)

La beta- lactoglobulina (BLG) es la proteína sérica más abundante en la leche de los rumiantes, considerada la primera proteína láctea estudiada cerca de los años 50 [3], aunque no se le ha atribuido ninguna función biológica definitiva, la composición aminoacídica y la cantidad de BLG presente en la leche de los rumiantes respaldan un posible papel nutricional de esta proteína. Sin embargo, su similitud en secuencia y estructura terciaria con otros miembros de las lipocalinas, sugiere una función de esta proteína en el transporte de moléculas hidrofóbicas [4, 17].

En el bovino *Bos taurus-indicus*, el gen de la BLG consta de 897 pares de bases (pb) y está ubicado en el cromosoma 11 [11], presenta diferentes variantes las cuales difieren entre sí por sustituciones de uno o más aminoácidos en la secuencia de la proteína, las variantes comúnmente conocidas son A y B [9], el alelo C no es común y fue encontrado en la raza Jersey (australiana y alemana), mientras que la variante D fue observada en otras razas (Simmental, Italian Brown, Reggiana, Modenese, Modicana, Rendena) y las variantes E, F y G hasta ahora, sólo han sido encontradas en Bali (Banteng), *Bos javanicus* [9, 13, 26].

De este amplio polimorfismo, parece ser que la variante B es la más ancestral, debido a su alta frecuencia y prevalece en algunas razas europeas, cebuínas y mestizos, como Pardo Suizo, Jersey, Guernsey, Swedish Red y White, Nelore, Gyr, Guzerá, Canchim, Santa Gertrudis, Ayrshire, Shorthorn, Danés Rojo y en el Cebú Asiático y Africano; así como también, en ganado italiano, mientras que, en algunas razas como la Holstein, Criollos Saavedreño, Chusco, Argentino y Chaqueño, Siboney, Cebú y Criollo Cubano, los dos alelos, tanto el A como el B, presentan una frecuencia similar [1, 5, 10, 11, 13, 19, 21, 23, 26, 31, 33, 34, 37, 38].

El polimorfismo genético de las proteínas lácteas ha recibido considerable interés, debido a la posible asociación entre los genotipos de las proteínas de la leche y las características de importancia económica del ganado, ya que se encuentran asociados con la producción de leche, composición de la leche y producción de queso [5, 13, 31, 34]. Así se ha señalado que el genotipo AA de la BLG ha sido asociado con una mayor producción de proteína total y beta-lactoglobulina; mientras que, el genotipo BB se ha asociado con mayor cantidad de grasa y caseína, por lo tanto, la leche de los animales portadores de estos alelos tienen una mayor capacidad quesera, debido a que producen más caseínas y menos beta-lactoglobulina [18, 22].

El uso de esta información en programas de mejoramiento es ampliamente recomendado para la selección de vacas y toros, buscando genotipos favorables, que permitan incrementar sus frecuencias en la población [12]. Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar las frecuencias alélicas y genotípicas de los alelos A y B de BLG en el Criollo Limonero a través de la técnica de la reacción en cadena de polimerasa y la detección de polimorfismo en la longitud de los fragmentos restringidos (PCR-RFLP).

## MATERIALES Y MÉTODOS

El ADN se extrajo de muestras de sangre de 163 animales de la raza Criollo Limonero, las cuales fueron tomadas de la vena yugular [2]. Los animales provinieron de un rebaño de 350 animales puros localizado en la estación local

Carrasquero adscrita al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-Zulia).

El fragmento amplificado constó de 262 pares de base (pb) y se obtuvo utilizando los oligonucleótidos BLGP3: 5'-GTCCTTGTGCTGGACACCGACTACA-3' y BLGP4: 5'-CAGGACACCGGCTCCCGGTATATGA-3' [23]. Para la reacción de PCR se utilizó 2.5 µL de buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dntp's, 0,6 pmol primers, 0,63 U de Taq polimerasa y ADN 50 ng., se usó un termociclador (Mastercycler ep-gradient (S), Eppendorf, North America), la amplificación se realizó en tres fases: una primera fase de separación de las dos hebras del ADN a 95°C por 5 min, la segunda fase de 30 ciclos que oscilan en series de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 58°C y 45 segundos a 72°C, y una tercera fase de finalización para una extensión a 72°C durante 5 min. Para determinar los genotipos de la BLG, las variantes alélicas se obtuvieron a partir de la digestión del producto amplificado a través de la técnica PCR -RFLP utilizando la enzima *Hae* III (Promega)®. La mezcla constó de 0,5 µL (5U) de la enzima, 6,5 µL de agua, 2 µL de Buffer B, 1 µL de BSA y 10 µL de producto amplificado [25].

Tanto la visualización del producto amplificado como las variantes alélicas fueron identificadas a través de geles de agarosa preparados con solución tampón TAE 1x (Tris-EDTA-Acido Acético, pH 8,1) al 1,5% para observar el producto de amplificación y al 3% para observar el producto de la digestión. La electroforesis se realizó en una cámara horizontal (Fisher Scientific Electrophoresis Systems, Illinois, EUA) modelo FB-SB-1316 a 50V durante 5 min y 100V durante 45 min, luego los geles fueron teñidos con bromuro de etidio para la posterior visualización de las bandas en un transluminador UV (UVP, High performance 302 nm, Canadá).

El cálculo de las frecuencias génicas y alélicas se realizó por conteo directo, y el equilibrio de Hardy Weinberg se determinó mediante la prueba Ji-cuadrado [24] utilizando el programa GENEPOP 3.1 [32].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por la técnica de PCR se logró amplificar un fragmento de 262 pb, correspondiente al gen de la BLG y a través del uso de la enzima de restricción *Hae* III, se pudo diferenciar satisfactoriamente los tres genotipos de esta proteína, obteniéndose para el genotipo AA la presencia de dos bandas las cuales presentaron pesos de 153 y 109 pb, el genotipo AB presentó tres bandas cuyos pesos fueron 153, 109 y 74/79 pb, mientras que, el genotipo BB, expresó dos bandas 109 y 74/79 pb (FIG. 1).

Las frecuencias genotípicas obtenidas fueron 0,07 (12/163), 0,29 (47/163) y 0,64 (104/163) para los genotipos AA, AB y BB, respectivamente, correspondieron por lo tanto con frecuencias alelicas o génicas de 0,22 y 0,78 para los alelos A y B, respectivamente, encontrándose la población en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) (TABLA I).

El genotipo más frecuente encontrado en la población fue el BB, seguido del genotipo AB y menos frecuente resultó ser el genotipo AA, coincidiendo este comportamiento a lo reportado para el Criollo Saavedreño, Siboney, Cebú Cubano y Guernsey. No obstante, difieren claramente con lo encontrado en los Criollos Patagónico, Chaqueño, Yacumeño, Chusco y Uruguayo, los cuales presentaron menores valores para el genotipo BB [21, 30, 37, 38].

Con respecto a las frecuencias alélicas, se debe destacar, que estos valores obtenidos del alelo B de BLG coinciden con lo reportado por varios autores en ganado criollo latinoamericano como el Saavedreño, Chusco, Argentino, Chaqueño y Cubano, al igual, que lo presentado en otras razas tales como: Holstein, Pardo Suizo, Jersey, Guernsey, Swedish Red y White, Nelore, Gyr, Guzerá, Canchim, Santa Gertrudis, Siboney y Cebú, las cuales han mostrado mayor frecuencia para el alelo B con respecto al alelo A [6, 19, 21, 23, 34, 37, 38].

No obstante, estos resultados difieren de lo reportados en el Criollo Uruguayo y a las observaciones en Criollo Yacumeño, cuyas frecuencias para el alelo B fueron similares a las frecuencias del alelo A; o bien, a lo reportado en el Criollo Patagónico, Caracú y Charoláis, donde las frecuencias obtenidas del alelo A fueron más altas que las del alelo B [19, 21, 30, 33].

La importancia de este estudio radica principalmente, en conocer el estatus actual de los alelos de la BLG en la raza Criollo Limonero, que permitan determinar los genotipos presentes y sus frecuencias, a manera de poder realizar selección por aquellos genotipos más deseados en la población. El hallazgo de una mayor frecuencia del alelo B en la población, orienta una posibilidad de que sus producciones lácteas sean de una mayor cantidad de sólidos totales, ideales para la producción de quesos, ya que estudios previos han demostrado cierta asociación de este gen con un menor contenido de betalactoglobulina y un mayor contenido de caseínas, proteínas totales y grasa en la leche, lo que resulta en mejores propiedades para la industria quesera [6 - 8, 14, 16, 20, 27, 28, 38].

## CONCLUSIONES

En la raza Criollo Limonero el alelo predominante de la BLG resultó ser el B con una frecuencia de 0,78, siendo la frecuencia genotípica mayoritaria BB con 0,64 en esta población. De acuerdo a estos resultados, la raza Criollo limonero representa una alternativa de uso en los sistemas doble propósito dirigidos hacia la producción de queso, en virtud que el alelo B de la BLG ha sido asociado con mayor contenido de grasa y caseína en la leche; esto aunado a su adaptación en el medio tropical, características que la convierte en una raza promisoría.

Durante los últimos años, la selección en ganado de leche se ha realizado principalmente por características de importancia económica como son, la producción de leche, proteína y grasa, cuya mejora es relativamente lenta, ya que se encuentran controladas por múltiples *loci*, de allí que la genética molecular podría incrementar la precisión de las evaluaciones genéticas.

Frame\_35.JPG

[Frame 42](#)

## RECOMENDACIONES

A la luz de los hallazgos obtenidos, se hace indispensable continuar estos estudios, relacionando los genotipos presentes con características de interés (producción láctea, grasa y proteína), de manera de poder dar a conocer con datos propios, la posible asociación o no de estas características en la ganadería venezolana.

## AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento de la presente investigación (CC-0928-06).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]

ARANGUREN, J. Aplicación de la genética molecular para la selección de caracteres de interés en la producción de leche. En: **Alcances y Perspectivas: En la Mejora Genética de la Ganadería Doble Propósito. XLIII Reunión del GIRARZ**. Maracaibo 24-26/03. Venezuela. 84-98 pp. 2006.

[2]

ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; AVELLANET, R.; TORRENS, M. Estudio de la variabilidad genética en la raza bovina Mallorquina para propósitos de conservación. **Rev. Científ. FCV-LUZ**. XII (5): 358-366. 2002.

[3]

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. Genetics of the b-lactoglobulins of the cow's milk. **Nature** 180: 376-378. 1955.

[4]

BALLESTER, M. La b-lactoglobulina y su aplicación en transgénesis. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra-España. Tesis de Grado. 125 pp. 2005.

[5]

BECH, A.; KRISTIANSEN, M. Milk protein polymorphism in Danish dairy cattle and the influence of genetic variants on milk yield. **J. Dairy Res.** 57: 53-62. 1990.

[6]

BONVILLANI, A.; DI RENZO, M.; TIRANTE, I. Genetic polymorphism of milk protein loci in Argentinian Holstein cattle. **Genet. and Molec. Biol.** 23(4): 819-823. 2000.

[7]

BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **J. Dairy Sci.** 75:2549. 1992.

[8]

CERBULIS, J.; FARRELL, H. Composition of milks of dairy cattle. I. Protein, lactose, and fat contents and distribution of protein fraction. **J. Dairy Sci.** 58:817. 1974.

[9]

CREAMER, L.; NILSSON, H.; PAULSSON, M.; COKER, C.; HILL, J.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Effect of genetic variation on the tryptic hydrolysis of bovine b- lactoglobulina A, B y C. **J. Dairy Sci.** 87:4023-4032. 2004.

[10]

EIGHEL, W.; BUTLER, J.; ERSTROM, C.; FARREL, H.; HARWALKER, V.; JENNESS, R.; WHITNEY, R. Nomenclature of protein of cow's milk: fifth revision. **J. Dairy Sci.** 67: 1599-1631. 1984.

[11]

EGGEN, A.; FRIES, R. An intregated cytogenic and meiotic map of the bovine genome. **Anim. Genet.** 26: 216-236.

[12]

FELMER, R.; BUTENDIECK, N. Frecuencia alélica del gen de la k-caseína bovina en un rebaño Frisón Negro Chileno. **Arch. Med. Vet.** 30(2): 145-150. 1998.

[13]

Formaggioni, P., Summer, A.; Malcarne, M.; Mariani, P. Milk protein polymorphism: detection and diffusion of the genetic variants in *bos genus*. 1999. Univ degli Studi di Parma An della Facolta di Med Vet. On Line: <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/index2.htm>. 10-12-2008.

[14]

GONYON, D.; MATHER, R.; HINES, H.; HAENLEIN, G.; ARAVE, C.; GRANT, S. Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits: Holstein. **J. Dairy Sci.** 70: 2585 - 2598. 1987.

[15]

GONZÁLEZ, R.; VELARDE, J.; ZAMBRANO, S.; ESTÉ, P. Producción y transplante de embriones congelados de Bovinos Criollo Limonero. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** 5 S (1):370-372. 1997.

[16]

HAENLEIN, G.; GONYON, D.; MATHER, R.; HINES, H. Associations of bovine blood and milk polymorphisms with lactation traits. Guernseys. **J. Dairy Sci.** 70 : 2599 - 2609. 1987.

[17]

HAMBROEUS, L.; LÖNNERDAL, B. Genetic polymorphism of milk proteins. In: **Advanced Dairy Chemistry – 1 proteins**. P. F. Fox (Ed). Elsevier Applied Science, New York, NY. 605-640 pp. 2003.

[18]

IKONEN, T.; OJALA, M.; RUOTTINEN, O. Associations between milk protein polymorphism and first lactation milk production traits in Finnish Ayrshire cows. **J. Dairy Sci.** 82: 1026-1033. 1999.

[19]

KEMENES, P.; DE ALMEIDA, R.L.; DE MAGALHAES R., A.; PACKER, I.; RAZOOK, A.; DE FIGUEREIDO, L.; SILVA, N.; ETCHEGARAY, M.; COUTINHO, L. K-casein; b-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distance in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis Cattle. **Genet. and**

**Molec. Biol.** 22(4): 539-541. 1999.

[20]

LIN, C.; MCALLISTER, A.; NG-KWAI-HANG, K.; HAYES, J.; BATRA, T.; LEE, J.; ROY, G.; VESELY, J.; MAUTHY, J.; WINTER, K. Association of milk protein types with growth and reproductive performance of dairy heifers. **J. Dairy Sci.** 70:29-39. 1987.

[21]

LIRÓN, J.; RIPOLI, M.; D LUCA, J.; PERAL, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Análisis of genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian creole cattle using five loci related to milk production. **Genet. and Molec. Biol.** 25(4): 413-419. 2002.

[22]

LÓPEZ, E.; VÁSQUEZ, N. Determinación del sexo y genotipificación del gen de la k-caseína en embriones bovinos. **Rev. Col. Cien. Pec.** 17:231-240. 2004.

[23]

LUNDÉN, A.; NILSSON, M.; JANSON, L. Marked effect of b-lactoglobulin polymorphism on the ratio of casein to total protein in milk. **J. Dairy Sci.** 80:2996–3005. 1997.

[24]

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. The SAS system for windows. Cary. University North of Caroline. USA. Versión 9.2. 2002.

[25]

MEDRANO, J.; AGUILAR-CÓRDOVA, E. Genotyping of bovine kappa-casein loci following ADN sequence amplification. **Biotechnol.** 8:144-146. 1990.

[26]

NG-KWAI-HANG, K.; GROSCLAUDE, F. Genetic polymorphism of milk proteins. In: **Advanced Dairy Chemistry – 1 proteins.** P. F. Fox. (Ed). Elsevier Applied Science, New York, NY.739-773 pp. 2003.

[27]

NG-KWAI-HANG, K.; HAYES, J.; MOXLEY, J.; MONARDES, H. Relationships between milk protein polymorphisms and major milk constituents in Holstein-Friesian cows. **J. Dairy Sci.** 69: 22-26. 1986.

[28]

NG-KWAI-HANG, K.; MONARDES, A.; HAYES, J. Association between genetic polymorphism of milk proteins and production traits during three lactations. **J. Dairy Sci.** 73:3414. 1990.

[29]

PÁEZ, L. Comportamiento productivo del rebaño Criollo Limonero en el Piedemonte Barinés. **INIA Divulga** 6:33-37. 2005.

[30]

POSTIGLIONI, A.; RINCÓN, G.; NELLY, L.; LLAMBÍ, S.; FERNÁNDEZ, G.; D'ANGELO, M.; GAGLIARDI, G.; TRUJILLO, J.; DE BETHENCOURT, M.; GUEVARA, K.; CASTELLANO, A.; ARRUGA, M. Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. Análisis con marcadores moleculares. **Arch. Zoot.** 51: 195-202. 2002.

[31]

RACHAGANI, S.; GUPTA, I.; GUPTA, N.; GUPTA, S. Genotyping of b Lactoglobulin gene by PCR-RFLP in Sahiwal

and Tharparkar cattle breeds. **BMC Genet.** 7:31. 2006.

[32]

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (versión 3.1): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.** 83:239. 1995.

[33]

RINCÓN, G.; ARMSTRONG, E.; POSTIGLIONI, A. Analysis of the population structure of Uruguayan Creole cattle as inferred from milk major gene polymorphisms. **Genet. and Molec. Biol.** 29 (3): 491-495. 2006.

[34]

RIPOLI, M.; CORVA, P.; ANTONINI, A.; DE LUCA, J.; ROJAS, F.; DULOUT, F.; GIOVAMBATTISTA, G. Asociación entre cinco genes candidatos y producción de leche en la raza criolla Saavedreña. **Arch. Zoot.** 52: 89-92. 2003.

[35]

ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M.; MORISSET, J.; PETITCLERC, D. Quantitative analysis of b-Lactoglobulin A and B genetic variants in milk of cows b-Lactoglobulin AB throughout lactation. **J. Dairy Res.** 69:651-654. 2002.

[36]

RODAS-GONZÁLEZ, A.; VERGARA-LÓPEZ, J.; ARENAS DE M., L.; HUERTA-LEIDENZ, N.; PIRELA, M. Características al sacrificio, rasgos de la canal y rendimiento carnicero de novillos criollo limonero sometidos a suplementación durante la fase de ceba a pastoreo. **Rev. Científ. FCV-LUZ XVI(4):** 364-370. 2006.

[37]

UFFO, O.; MARTÍN, I.; MARTÍNEZ, S.; RONDA, R.; OSTA, R.; RODELLAR, C.; ZARAGOZA, P. Caracterización genética de seis proteínas lácteas en tres razas bovinas cubanas. **AGRI.** 39: 15-24. 2006.

[38]

VAN EENENNAAM, A.; MEDRANO, J. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 74: 1730-1742. 1991.